環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験結果報告書

環境技術開発者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》マラチオン測定キット

平成１７年３月

山　口　県

はじめに

環境技術実証モデル事業は、既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成１６年８月３１日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

（実証項目）

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

本報告書は、その結果を取りまとめたものである。

（実証機関）

山口県環境保健研究センター

所　　長　　宮村　惠宣

（要　　約）

製品名称	マラチオン測定キット
環境技術開発者	（株）ホリバ・バイオテクノロジー
実証機関	山口県
対象物質	マラチオン
実証試験の実施期間	平成 17 年 1 月 27 日～平成 17 年 2 月 28 日

１．実証対象技術の概要

本実証対象製品は、マラチオンに特異的な抗体を応用した、環境中のマラチオン測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（マラチオン濃度が高い試料では吸光度が低く、マラチオン濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

２．実証試験の概要

実証試験項目の内容は、次のとおりである。

項　　目	内　　容
１．基本的な性能	
(1)測定範囲	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	市販標準品で調製した指定濃度系列の中央付近の試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	同一測定者が市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。

(7)交差反応性	市販標準物質及び類似物質を用い調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
２．実用的な性能	
(1)回収特性	環境試料を模擬し市販標準品で指定濃度範囲の中央付近の１濃度に混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	複数の河川地点から得られた河川水の環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

３．実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、次のとおりである。

項　目	記　入　欄
製品名	マラチオン測定キット
型番	EL206-00
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（ｇ）	350　ｇ
価格（円）	99,750　円
分析対象物質	マラチオン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（　農産物　）
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属（ 調製済 ／ 調製要 ）
操作環境（室温）	室温
製品保管条件	８℃以下
製品保証期間	製造後７ヶ月間
同時測定数	４６試料
測定時間	２～３時間

４．実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	山口県	
製品名称	マラチオン測定キット	
環境技術開発者	(株)ホリバ・バイオテクノロジー	
対象物質	マラチオン	
実証試験計画書の策定	平成 16 年 12 月	
実証試験の実施期間	平成 17 年 1 月 27 日～平成 17 年 2 月 28 日	
1）基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
①測定範囲	調製濃度: 15～250μg/L での相対値：98.8～143.6%、CV：1.2～9.0%	15～250μg/L
②検出下限及び定量下限	調製濃度 15μg/L の SD から求めた 検出下限（3SD）：3.8μg/L、 定量下限（10SD）：12.8μg/L	―
③繰返し再現性	調製濃度 60μg/L での CV：3.3%、SD：1.9μg/L	同時再現性 CV：6.3～9.4%
④日間再現性	調製濃度 15～250μg/L での CV（3 日間）：3.1～9.8%	日間再現性 CV：4.3～13.4%
⑤期間再現性	調製濃度 15～250μg/L で、1ヶ月を隔てて 2 回測定した値の CV:1:0 ヶ月 1.2～9.0% 1ヶ月後 2.2～4.4%	保存安定性 270 日保存で吸光度(B/B0)の変動が 20%以内
⑥プレート間再現性	調製濃度 15～250μg/L での CV： （同一ロットプレート 2 枚、異ロットプレート 1 枚間）：5.3～7.5%	-
⑦交差反応性	交差反応率： フェニトロチオン 0.7% フェノブカルブ ＜0.1%	交差反応率： フェニトロチオン 0.9% フェノブカルブ ＜0.1%
2）実用的な性能		
①回収特性	マラチオンを添加（60μg/L）した河川水に、ﾌｪﾆﾄﾛﾁｵﾝﾅﾄﾘｳﾑを添加（0,1,5,10,50mg/L）した試料の回収率：各々97.7%、95.9%、110.1%、119.7%、250.2%	しろねぎに対する添加回収試験の回収率：109.8～136.1%
②測定精度等	・河川水を直接測定：ELISA 法及び機器分析とも定量下限未満 ・公共用水域における水質評価指針値 10μg/L を考慮し、河川水に 1μg/L、5μg/L、10μg/L、20μg/L 相当添加したときの ELISA 法回収率：452%、156%、145%、124%	-
③その他		
結果の検討と考察		

1）製品性能の信頼性：実証試験で実施した基本性能７項目の全ての結果から 15～100μg/L の濃度範囲においては、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。

2）一般環境モニタリングでの実用性：環境試料として河川水にマラチオンを添加した実証試験の結果から、20μg/L 以上の濃度であれば、水質モニタリング等の実用化が可能である。

3）製品操作等の簡便性：一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理がない場合、約３時間で測定結果が得られた。同時に約２５試料（３重測定）の測定が可能である。

なお、本試験での GC/MS－SIM 法では、３試料（３重測定）の測定に約３日が必要である。

（本　　編）

目　次

1. 実証試験の概要……1
1.1 実証対象製品のデータ……1
1.2 実証試験結果……2
(1)基本的な性能……2
(2)実用的な性能……3
2. 実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明……4
2.1 実証申請者……4
2.2 実証対象技術の原理……4
2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等）……4
3. 実証試験実施体制……5
3.1 実証試験申請者……5
3.2 実証試験実施者……5
3.3 実証試験実施場所……5
(1)ＥＬＩＳＡ法……5
(2)機器分析法……5
3.4 実証試験実施期間……5
4. 試験方法……6
4.1 共通して行う試験操作……6
(1)製品の操作……6
(2)検量線作成用標準溶液の調製……6
(3)吸光度の測定……6
(4)検量線の作成……6
(5)実測濃度の算出……6
4.2 基本的な性能……7
(1)測定範囲……7
(2)検出下限及び定量下限……8
(3)繰返し再現性……9
(4)日間再現性……10
(5)期間再現性……11
(6)プレート間再現性……12
(7)交差反応性……13
4.3 実用的な性能……15
(1)回収特性……15
(2)測定精度等……16
5. 試験結果……18
5.1 基本的な性能……18
(1)測定範囲……18

(2)検出下限及び定量下限 19
(3)繰返し再現性 21
(4)日間再現性 22
(5)期間再現性 26
(6)プレート間再現性 28
(7)交差反応性 32
5.2 実用的な性能 36
(1)回収特性 36
(2)測定精度等 38
6.実証試験結果の検討と考察 42

付録： 実証試験計画書

1. 実証試験の概要

1.1 実証対象製品のデータ

実証試験実施者等並びに環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 1.1.1 実証対象製品のデータ

項　目	内　　容
技術・製品の名称	マラチオン測定キット
実証申請者	株式会社ホリバ･バイオテクノロジー　代表取締役社長　河野　猛
実証試験実施者	山口県環境保健研究センター　所長　宮村惠宣
実証試験実施場所	〒753-0821 山口市葵 2 丁目 5-67 山口県環境保健研究センター　葵庁舎　（ELISA 法） 〒753-0871 山口市朝田 535 山口県環境保健研究センター　大歳庁舎　（機器分析法）
実証試験期間	平成 17 年 1 月 27 日～平成 17 年 2 月 28 日
製品名	マラチオン測定キット
型番	EL206-00
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（ｇ）	350 ｇ
価格（円）	99,750　円
分析対象物質	マラチオン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（　農産物　）
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属（ 調製済 ／ 調製要 ）
操作環境（室温）	室温
製品保証条件	８　℃以下
製品保証期間	製造後　７　ヶ月間
同時測定数	４６　試料
測定時間	２～３　時間

＜参　考＞

マラチオン

有機りん系殺虫剤（別名：マラソン、農林業を中心に広く使用）

法規制等の状況

・環境省 SPEED’98 の「内分泌かく乱作用を有すると疑われる物質」

・PRTR 法の第 1 種指定化学物質（政令番号 155）

・「公共用水域等における農薬の水質評価指針」（平成 16 年 4 月 15 日環水土第 86 号）対象農薬（指針値 0.01mg/l 以下）

・水道法に係る水質管理目標設定項目（目標値 0.05mg/l 以下）

1.2 実証試験結果

(1)基本的な性能

①測定範囲

製品の測定範囲に調製した試験用試料溶液(15,40,100,250μg/L)を測定した実測値の相対値は、98.8～143.6%、変動係数は、1.18～8.98%であった。

(製品の測定範囲は、15～250μg/L)

②検出下限及び定量下限

製品の測定範囲の下限付近(15μg/L)に調製した試験用試料溶液を繰返し(n=8)測定した実測値の標準偏差(SD)から求めた検出下限(3SD)は、3.842μg/L、定量下限(10SD)は、12.806 であった。

(製品の測定下限は、15μg/L)

③繰返し再現性

製品の測定範囲の直線域(60μg/L)に調製した試験用試料溶液を繰返し(3 重測定で 8 回測定)測定した測定値の変動係数は 3.27%(標準偏差 1.911μg/L)であった。

(製品の同時再現性試験での変動係数は、6.3～9.4%)

④日間再現性

製品の測定範囲(15～250μg/L)に調製した試験用試料溶液を、3 日間(1 週間以内)測定した実測値(3 重測定の平均値)の変動係数は、3.08～9.78%であった。

(製品の日間再現性試験での変動係数は、4.3～13.4%)

⑤期間再現性

製品の測定範囲(15～250μg/L)に調製した試験用試料溶液を、同一ロットのプレートを用い、1ヶ月の期間を隔てて 2 回測定した。各試料溶液について 3 重測定を行った各 OD 値をそれぞれ濃度に換算した 3 つの値の間の変動係数は、0 ヶ月・1ヶ月後とも 10%以内(1.18～8.98%)であった。

(製品の保存安定性試験のデータは、270 日保存で吸光度(B/Bo)の変動が 20%以内)

⑥プレート間再現性

製品の測定範囲(15～250μg/L)に調製した試験用試料溶液を、同一ロットの 2 プレート(A,B)と、異なるロット(C:製造年月日は A、B より 5 ヶ月前)の 1 プレートを同日に測定した測定値の変動係数は、5.28～7.55%であった。

(製品のデータは示されていない)

⑦ 交差反応性

交差反応率は、フェニトロチオンは 0.7%、フェノブカルブは 0.1%未満であった。

（製品の交差反応率のデータは、フェニトロチオン 0.9%、フェノブカルブ＜0.1%）

(2) 実用的な性能

① 回収特性

河川水に測定範囲の中央付近のマラチオン（60μg/L）を添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加（0,1,5,10,50mg/L）した試験用試料溶液の測定結果は、高濃度のフミン酸ナトリウムを添加した試料で、正の誤差がみられた。（50mg/L のとき、回収率 250.23%）

② 測定精度等

河川水（3 地点）を測定したところ、ELISA法、機器分析法とも、マラチオンの測定値は定量下限未満であった。

そこで、公共用水域における農薬の水質評価指針値 10μg/L を考慮し、河川水に 1μg/L、5μg/L、10μg/L 、20μg/L 相当のマラチオンを添加してELISA法で測定したところ、回収率は順に 452%、156%、145%、124%であり、実試料で 1μg/L のような低濃度の場合は実際よりかなり高い値を示すが、水質評価指針値付近の濃度はほぼ測定可能であることがわかった。

2.実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明

2.1 実証申請者

企　業　名：株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
代　表　者：代表取締役社長　河野　猛
担当者所属・氏名：試薬事業部　開発・製造部　伊東　茂壽
住　　所　：京都市南区吉祥院車道町４８番地
電話番号　：075-692-1786
ＦＡＸ番号：075-692-1790
e-mail アドレス：Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、マラチオンに特異的な抗体を応用した、環境中のマラチオン測定 ELISA キットである。

2.3 実証対象製品のデータ

実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 2.3.1 製品データ

項　目	内　　容
製品名	マラチオン測定キット
型番	EL206-00
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（g）	350 g
価格（円）	99,750　円
分析対象物質	マラチオン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（　農産物　）
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属（ 調製済 ／ 調製要 ）
操作環境（室温）	室温
製品保管条件	８　℃以下
製品保証期間	製造後　７　ヶ月間
同時測定数	４６　試料
測定時間	２～３　時間

3. 実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

実施責任者：山口県環境生活部　環境生活部長　松原　清
所属部署　：山口県環境生活部環境政策課環境保全室　化学物質対策班
担当者氏名：主幹　上田　洋一
住　　所　：〒753-8501 山口市滝町１番１号
電話番号　：083-933-3034
ＦＡＸ番号：083-933-3049
e-mail アドレス：ueda.youichi@pref.yamaguchi.lg.jp

3.2 実証試験実施者

実施責任者：山口県環境保健研究センター　所　　長　宮村　惠宣
実証試験担当者氏名：(ELISA 法)生物学部　専門研究員　數田　行雄
専門研究員　吹屋　貞子
(機器分析法)水質部　研　究　員　古谷　典子
連 絡 窓 口：企画情報室　室長　古谷　長藏
住　　所　：〒753-0871 山口市朝田５３５
電話番号　：083-924-3670
ＦＡＸ番号：083-924-3673
e-mail アドレス：furutani.chozo@pref.yamaguchi.lg.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) ＥＬＩＳＡ法
山口県環境保健研究センター　葵庁舎
(2) 機器分析法
山口県環境保健研究センター　大歳庁舎

3.4 実証試験実施期間

平成１７年1月２７日～平成１７年2月２８日

4.試験方法

4.1 共通して行う試験操作

「4.2 基本的な性能」及び「4.3 実用的な性能」において、以下の方法は共通である。

(1) 製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル　ＥＬＩＳＡ法（マラチオン）」の試験操作手順（一般的な事項）に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液の調製

製品の取扱説明書に記載の方法により、検量線用標準溶液の指定濃度系列を調製した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド社製マイクロプレートリーダー）で測定し、検量線作成用標準溶液及び各試験用試料溶液の吸光度とした。

(4) 検量線の作成

プレート毎に同時に測定したゼロブランク（ＢＬＫ：添付の希釈液等）及び検量線作成用標準溶液の吸光度（３重測定の平均値）から取扱説明書に従って検量線（取扱説明書の指示：４パラメーターによりロジスティック曲線を近似した標準曲線）を作成した。

なお、解析に使用したバイオ・ラッド社製Microplate Manager/PC(Windows版v.5.2.1)は、仕様上回帰式のR^2が計算されないので求めなかった。

(5) 実測濃度の算出

「(4)検量線の作成」で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出した。

4.2 基本的な性能

(1) 測定範囲

① 試験条件

本製品の測定範囲における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.1 測定範囲の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・測定範囲(標準試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成 16 年 12 月 2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～ 250 μg/L
試験日時	平成 17 年 1 月 27 日 15：30 ～ 17：40
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	20.0℃～20.7℃
使用した市販標準品	物質名：マラチオン 試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：138-05513 ロット番号：RWE9466
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

② 試験操作

マラチオン標準品を用い、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（0, 15, 40, 100, 250 μg/L）を調製した。調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき 3 重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求めた。

(2) 検出下限及び定量下限

① 試験条件

本製品の検出下限及び定量下限における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.2 検出下限及び定量下限の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限及び定量下限(標準試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成　16 年　12 月　2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～　250 μg/L
試験日時	平成 17 年　1 月　27 日　　15:30 ～ 17:40
試験場所	山口県環境保健研究センター　葵庁舎
試験時室内温度	20.0℃　～　20.7℃
使用した市販標準品	物質名：マラチオン　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：138-05513　ロット番号：RWE9466
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部　専門研究員　吹屋貞子

② 試験操作

マラチオン標準品を用い、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液（15μg/L：測定範囲の下限付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を 8 回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求めた。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限及び定量下限とした。

(3) 繰返し再現性

① 試験条件

本製品の繰返し再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 繰返し再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・繰返し再現性(標準試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成 16 年　12 月　2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～　250 μg/L
試験日時	平成 17 年 1 月 31 日　　11：15　～　13：20
試験場所	山口県環境保健研究センター　葵庁舎
試験時室内温度	18.4.℃～19.1℃
使用した市販標準品	物質名：マラチオン　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：138-05513　ロット番号：RWE9466
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部　専門研究員　吹屋貞子

② 試験操作

マラチオン標準品を用い、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液（60μg/L：測定範囲の直線付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、得られた 8 個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求めた。求めた変動係数から、繰り返し再現性について検討した。

(4) 日間再現性

① 試験条件

本製品の日間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 日間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・日間再現性(標準試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成 16 年　12 月　2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～　250　μg/L
試験日時	平成 17 年 1 月 27 日　15：30　～ 17：40 平成 17 年 1 月 29 日　12：55　～ 14：55 平成 17 年 1 月 31 日　11：15　～ 13：20
試験場所	山口県環境保健研究センター　葵庁舎
試験時室内温度	20.0℃～20.7℃　(1/16) 20.4℃～20.6℃　(1/17) 18.4℃～19.1℃　(1/18)
使用した市販標準品	物質名：マラチオン　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：138-05513　ロット番号：RWE9466
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部　専門研究員　吹屋貞子

② 試験操作

同一測定者が 1 週間のうちの異なる 3 日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて、「（1）測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討した。

(5) 期間再現性

① 試験条件

本製品の期間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 期間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・期間再現性(標準試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号： K-MLT004E
製造年月日	平成　16 年　12 月　2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～　250　μg/L
試験日時	平成 17 年 1 月　27 日　15：30　～　17：40 平成 17 年 2 月　28 日　11：32　～　13：20
試験時室内温度	20.0 ～ 20.7 ℃ 18.0 ～ 18.9 ℃
試験場所	山口県環境保健研究センター　葵庁舎
使用した市販標準品	物質名：マラチオン　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：138-05513　ロット番号：RWE9466
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部　専門研究員　吹屋貞子

② 試験操作

同一ロットのプレートを用い、１ヶ月の期間を隔てて 2 回、同じ測定操作（「（１）測定範囲」に同じ）を行った。各測定結果（ＯＤ値）からの換算値（濃度）の変動係数を求め、期間を隔てての再現性について検討した。

(6) プレート間再現性

① 試験条件

本製品のプレート間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 プレート間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・プレート間再現性(標準試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E、K-MLT003E
製造年月日	平成 16 年 12 月 2 日（K-MLT004E)、平成 16 年 7 月 28 日（K-MLT003E)
測定範囲（製品仕様）	15 ～ 250μg/L
試験日時	平成 17 年 1 月 29 日　　10：50 ～17：00
試験場所	山口県環境保健研究センター　葵庁舎
試験時室内温度	19.1 ～ 20.9℃
使用した市販標準品	物質名：マラチオン　試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：138-05513　ロット番号：RWE9466
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部　専門研究員　吹屋貞子

② 試験操作

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「（1）測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討した。

(7) 交差反応性

① 試験条件

本製品の交差反応性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7 交差反応性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・交差反応性(標準試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成 16 年 12 月 2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～ 250μg/L
試験日時	平成 17 年 2 月 3 日　13：25 ～ 15：35 平成 17 年 2 月 4 日　11: 40 ～ 13:50
試験場所	山口県環境保健研究センター　葵庁舎
試験時室内温度	19.8 ～ 20.4℃（2/3） 19.5 ～ 20.5℃（2/4）
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部　専門研究員　吹屋貞子

表4.2.8 使用した市販標準品

物質名（標準品）		試薬会社名	規格	含量	製品番号	ロット番号
対象物質	マラチオン	和光純薬工業（株）	残留農薬試験用	min.98.0%	138-05513	RWE9466
類似物質	フェニトロチオン	和光純薬工業（株）	残留農薬試験用	min.98.0%	132-05533	RWE9339
	フェノブカルブ	和光純薬工業（株）	残留農薬試験用	min.98.0%	023-06773	RWE9394

表 4.2.9　試験用試料溶液

	物質名	試料溶液調製濃度
類似物質	フェニトロチオン	0, 1.5, 4, 10, 25 mg/L
	フェノブカルブ	0, 4, 10, 25, 60 mg/L

② 試験操作

マラチオン及び類似物質について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求めた）を描き、吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求めた。（マラチオンの 50%発色阻害濃度／類似物質の 50%発色阻害濃度）×100（%）で交差率を求めた。

類似物質を調節した濃度範囲内で 50%発色阻害濃度が求められなかった場合には、より低い発色阻害濃度から交差率を求めた。

4.3 実用的な性能

(1) 回収特性

① 試験条件

本製品の回収特性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.1 回収特性の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・回収特性(模擬環境試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成 16 年 12 月 2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～ 250μg/L
試験日時	平成 17 年 2 月 8 日 15：40 ～ 17：35
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	20.9 ～ 20.8℃
使用した市販標準品	物質名：マラチオン 試薬会社名：和光純薬工業（株） 製品番号：138-05513 ロット番号：RWE9466
使用した妨害物質名	物質名：フミン酸ナトリウム 試薬会社名：関東化学 製品番号：12086-1A ロット番号：A019444301
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

表 4.3.2 使用した河川水

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	仁保川	平成 17 年 1 月 31 日	4L×1 本	pH 6.9 COD 0.9mgO/L

② 試験操作

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるようにマラチオンを添加（60μg/L）するとともに、環境試料を想定した妨害物質としてフミン酸ナトリウムを添加（0，1，5，10，50 mg/L）して、試験用試料溶液を調製した。なお、フミン酸ナトリウムは、含量 50～60%の表示であったことから、平均含量 55%として試料の調製を行った。

調製した試験用試料溶液について、3 重測定した実測濃度から回収率を求め、妨害物質としてのフミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討した。

(2) 測定精度等

(2)-1　実試料分析

① 試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.3 測定精度等の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度等(環境試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成 16 年 12 月 2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～　250μg/L
試験日時	平成 17 年 2 月 1 日　11:25 ～　13:25
試験場所	山口県環境保健研究センター　葵庁舎（ELISA 法） 山口県環境保健研究センター　大歳庁舎（機器分析法）
試験時室内温度	18.3 ～ 18.5 ℃
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部専門研究員 吹屋貞子(ELISA 法 2/1) 山口県環境保健研究センター水質部研究員　古谷典子（機器分析法） 山口県環境保健研究センター水質部主任　田中克正（機器分析法）

表 4.3.4 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	仁保川	平成 17 年 1 月 31 日	4L×2 本	pH 6.9　COD 0.9mgO/L
S2	問田川	平成 17 年 1 月 31 日	4L×2 本	pH 7.2　COD 1.7mgO/L
S3	九田川	平成 17 年 1 月 31 日	4L×2 本	pH 7.2　COD 2.4mgO/L

② 試験操作

環境試料として河川水を使用し、河川水に不均一に含まれる懸濁物による影響を避けるため、採取日当日にグラスファイバーフィルター（ＧＦＣ：孔径 1.2μm）を用いてろ過したものを冷暗所保存しておき、試料として使用した。

ELISA 用の試料は、メタノールを添加（最終濃度 10%）してそのまま測定し、機器分析は試料を固液抽出後 GC/MS 法により測定した。

(2)-2 実試料添加試験

① 試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.5 測定精度等の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度等(環境試料試験)
対象物質	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ（環境測定用） マラチオン測定キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：K-MLT004E
製造年月日	平成 16 年 12 月 2 日
測定範囲（製品仕様）	15 ～ 250μg/L
試験日時	平成 17 年 2 月 18 日 17:30 ～ 19:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎（ELISA 法）
試験時室内温度	21.1 ～ 20.9 ℃
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC（バイオ・ラッド社製）
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部専門研究員 數田行雄(ELISA 法 2/18)

表 4.3.6 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	仁保川	平成 17 年 1 月 31 日	4L×1 本	pH 6.9 COD 0.9mgO/L

②試験操作

環境調査において、マラチオンの「公共用水域における農薬の水質評価指針」の指針値0.01mg/L(10μg/L)のチェックに当ELISAキットが適用できるかどうか確認するため、標準品の添加実験を行った。

河川水(S1)へのマラチオンの添加濃度（最終濃度）は、指針値（10μg/L）を考慮し、0、1、5、10、20μg/L とし、ELISA 法で３重測定した。

なお、測定時には 1/10 量のメタノールを添加するため、実際の濃度は 0、0.9、4.5、9、18μg/L）となる。

また、河川水は懸濁物による影響を避けるため、採取日当日にグラスファイバーフィルター（ＧＦＣ：孔径 1.2μm）を用いてろ過したものを冷暗所保存し、使用した。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	試験用試料溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1(S2)	STD2(S3)	STD(S4)	STD4(S5)
所定濃度		μg/L	0	15	40	100	250
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	−	1.666	1.054	0.710	0.378	0.202
	2	−	1.580	1.027	0.667	0.369	0.183
	3	−	1.576	1.025	0.668	0.374	0.180

表 5.1.2 採用した回帰式係数[Y = D + (A − D)/(1 + (X / C)^B)の場合]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.62	1.14	24.5	0.109	−

注) 解析に使用したバイオ･ラッド社製Microplate Manager/PC(Windows版v.5.2.1)は、仕様上回帰式のR^2が計算されないので記載しない。(以下、同様)

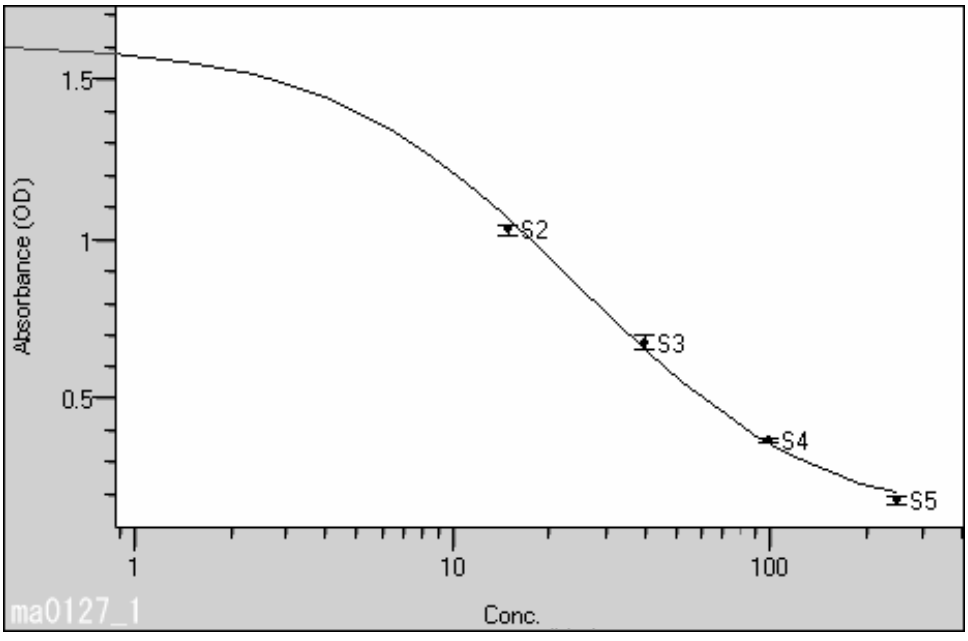

図 5.1.1 検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.3 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液				
				溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5
調製濃度			μg/L	0	15	40	100	250
実測回数			回	3	3	3	3	3
ELISA 実測	吸光度	1	－	1.548	1.102	0.668	0.343	0.174
		2	－	1.549	1.055	0.659	0.342	0.177
		3	－	1.500	1.031	0.661	0.355	0.179
		平均	－	1.532	1.063	0.663	0.347	0.177
	換算値		μg/L	2.017	15.177	39.513	106.861	358.925
標準偏差			μg/L	0.633	1.366	0.468	3.340	12.318
変動係数			%	31.39	8.98	1.18	3.12	3.43
相対値*			%	-	101.2	98.8	106.9	143.6

＊ 調整濃度を 100%としたときの各実測濃度（3 重測定の平均値）との割合（%）

(2) 検出下限及び定量下限

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.4 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	試験用試料溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)
所定濃度		μg/L	0	15	40	100	250
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	－	1.666	1.054	0.710	0.378	0.202
	2	－	1.580	1.027	0.667	0.369	0.183
	3	－	1.576	1.025	0.668	0.374	0.180

表 5.1.5 採用した回帰式係数[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B)の場合]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.62	1.14	24.5	0.109	―

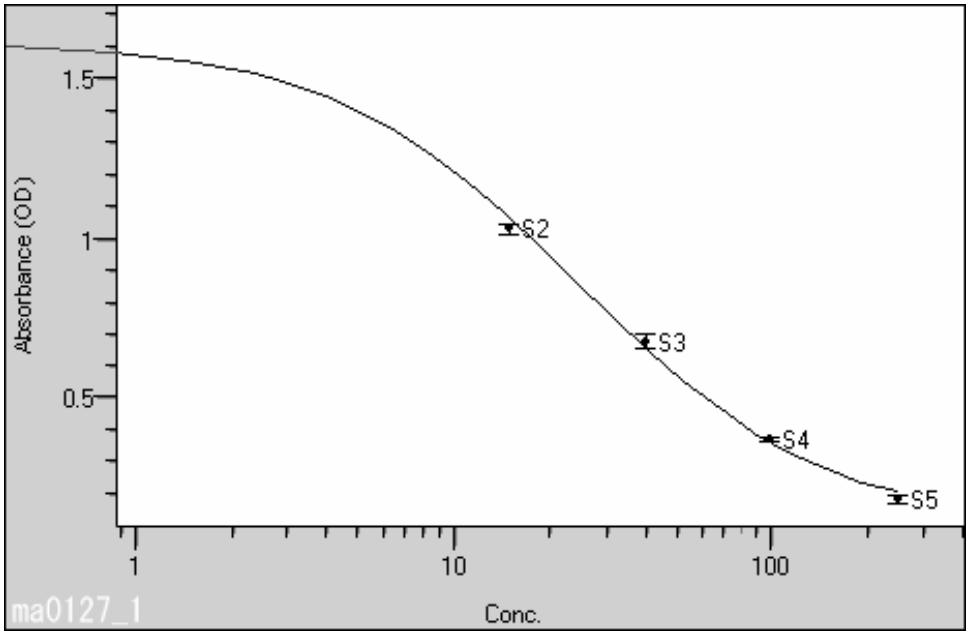

図 5.1.2 検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.6 対象物質試料溶液の測定データ

項目		単位	試験用試料溶液							
			溶液 S1							
調製濃度		μg/L	15	15	15	15	15	15	15	15
実測回数		回	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA 実測	吸光度	―	1.053	1.025	1.015	1.021	1.097	1.059	1.092	1.019
	換算値	μg/L	15.549	16.663	17.705	16.827	13.905	15.317	14.086	16.909
標準偏差		μg/L	1.281							

検出下限（3SD） ＝ 3.842

定量下限（10SD） ＝ 12.806

(3) 繰返し再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.7 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	試験用試料溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)
所定濃度		μg/L	0	15	40	100	250
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	－	1.586	1.003	0.612	0.322	0.175
	2	－	1.517	0.929	0.595	0.320	0.169
	3	－	1.456	0.921	0.576	0.308	0.161

表 5.1.8 採用した回帰式係数[Y = D + (A − D)/(1 + (X / C)^B)の場合]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.53	1.18	21.9	0.107	－

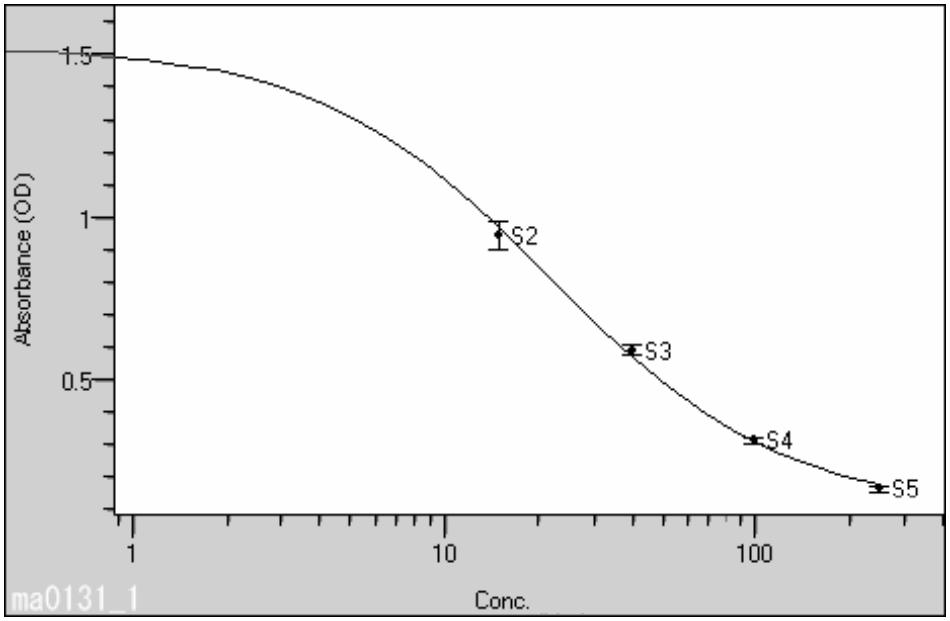

図 5.1.3 検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.9 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液							
				溶液 S3							
調製濃度			μg/L	60	60	60	60	60	60	60	60
実測回数			回	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA 実測	吸光度	1	−	0.455	0.476	0.479	0.441	0.459	0.469	0.443	0.432
		2	−	0.441	0.448	0.455	0.453	0.442	0.442	0.442	0.415
		3	−	0.444	0.446	0.455	0.448	0.452	0.432	0.445	0.441
		平均	−	0.447	0.457	0.463	0.447	0.451	0.448	0.443	0.429
	換算値		μg/L	58.60	56.73	55.59	58.48	57.78	58.41	59.25	62.10
標準偏差			μg/L	1.911							
変動係数			%	3.27							

(4) 日間再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.10.1 検量線用標準溶液の測定データ (1 日)

項目		単位	試験用試料溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)
所定濃度		μg/L	0	15	40	100	250
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	−	1.666	1.054	0.710	0.378	0.202
	2	−	1.580	1.027	0.667	0.369	0.183
	3	−	1.576	1.025	0.668	0.374	0.180

表 5.1.11.1 採用した回帰式係数[Y = D + (A − D)/(1 + (X / C)^B)の場合] (1 日)

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.62	1.14	24.5	0.109	−